

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 PH-999-PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/03372	国際出願日 (日.月.年) 25.05.00	優先日 (日.月.年) 25.05.99
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/11, C12Q1/68, C12N1/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	PubMed:10758895 A. Maruyama et al., "Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species <i>Psychrobacter pacificensis</i> sp. nov." Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, p. 835-846, Mar. 2000	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 08. 00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子



4 B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Marine Biology, 128, 1997	8-9
Y	A. Maruyama et al., "Low temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench" p. 705-711	1-7
Y	Applied and Environmental Microbiology, 63(8), Aug. 1997	1-7
A	John P. Bowman et al., "Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice", p. 3068-3078	8-9
Y	International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4),	1-7
A	Oct. 1996, John P. Bowman et al., "Novel Psychrobacter species from Antarctic ornithogenic soils", p. 841-848	8-9

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HIRAKI, Yusuke
Toranomon No.5 Mori Building Third
Floor
17-1, Toranomon 1-chome
Minato-ku
Tokyo 105-0001
JAPON

TECH CENTER 1600/2900

JUN 19 2002

Date of mailing (day/month/year) 20 décembre 2001 (20.12.01)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference PH-999-PCT	
International application No. PCT/JP00/03372	International filing date (day/month/year) 25 mai 2000 (25.05.00)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant
 ☐ the inventor
 ☐ the agent
 ☐ the common representative

Name and Address JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No. 0298-61-2175	
	Facsimile No. 0298-61-2174	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☒ the person
 ☐ the name
 ☐ the address
 ☐ the nationality
 ☐ the residence

Name and Address NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY 3-1, Kasumigaseki 1-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8921 Japan	State of Nationality JP	State of Residence JP
	Telephone No. 0298-61-2175	
	Facsimile No. 0298-61-2174	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
 ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority
 ☒ the elected Offices concerned
☐ the International Preliminary Examining Authority
 ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Y. KUWAHARA Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 20 December 2000 (20.12.00)	
International application No. PCT/JP00/03372	Applicant's or agent's file reference PH-999-PCT
International filing date (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)	Priority date (day/month/year) 25 May 1999 (25.05.99)
Applicant MARUYAMA, Akihiko et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
04 December 2000 (04.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Diana Nissen

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

7-T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

9/979558

Applicant's or agent's file reference PH-999-PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/03372	International filing date (day/month/year) 25 May 2000 (25.05.00)	Priority date (day/month/year) 25 May 1999 (25.05.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 1/20		
Applicant JAPAN as represented by SECRETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE AND TECHNOLOGY		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 04 December 2000 (04.12.00)	Date of completion of this report 16 July 2001 (16.07.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/03372

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/03372

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-7	YES
	Claims	8-9	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-9	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-9	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 8 and 9

Document 1 (A. Maruyama et al., "Low temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench", Marine Biology, 128, 1997, pp. 705-711) discloses aerobic, Gram negative, non-motile, non-sporulating and oxidase positive psychrotrophic bacteria thought to belong to the Moraxella-Psychrobacter group, isolated from deep sea water. Therefore, the inventions described in the above claims are not novel because the inventions described in the above claims are the same as an invention disclosed in Document 1.

Claims 1-7

Document 2: John P. Bowman et al., "Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice", Applied and Environmental Microbiology, 63 (8), Aug. 1997, pp. 3068-3078

Document 3: John P. Bowman et al., "Novel Psychrobacter species from Antarctic ornithogenic soils", International Journal of Systematic Bacteriology, 46 (4), Oct. 1996, pp. 841-848

Documents 2 and 3 disclose 16S rDNA sequences for Psychrobacter glacincola and Psychrobacter immobilis and

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/03372

for *Psychrobacter immobilis*, *Psychrobacter uratovorans*, *Psychrobacter frigidicola* and *Psychrobacter phenylpyruvici*, respectively, and preparation of a probe from a known sequence in a biological species and use of said probe in order to obtain the corresponding sequence in a related species were known art within this technical field at the time of filing the present application. Therefore, application of the aforementioned known art to a *Psychrobacter* species disclosed in Document 2 or 3 in order to obtain 16S rDNA of psychrotrophic bacteria disclosed in Document 1 and thus obtain 16S rDNA of a microorganism also thought to belong to the *Moraxella*-*Psychrobacter* group is obvious to a person skilled in the art. Comparison of long nucleotide sequences from related species and selection of a highly conserved region as a probe is also obvious to a person skilled in the art. Moreover, the inventions do not appear to offer any surprising effect which would not be expected from Documents 1-3 and known art. Therefore, the inventions described in the above claims do not involve an inventive step.

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
[PCT36条及びPCT規則70]

REC'D 03 AUG 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 PH-999-PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式PCT/ IPEA/416)を参照すること。		
国際出願番号 PCT/JPO0/03372	国際出願日 (日.月.年) 25.05.00	優先日 (日.月.年) 25.05.99	
国際特許分類(IPC) Int. Cl ⁷ C12N15/11, C12Q1/68, C12N1/20			
出願人(氏名又は名称) 工業技術院長が代表する日本国			

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条(PCT36条)の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

- ☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 04.12.00	国際予備審査報告を作成した日 16.07.01		
名称及びあて先 日本国特許庁(IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 小暮 道明 印	4B	9838
電話番号 03-3581-1101 内線 3448			

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-7	有
	請求の範囲	8-9	無
進歩性(IS)	請求の範囲		有
	請求の範囲	1-9	無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-9	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲8-9

文献1: Marine Biology, 128, 1997

A. Maruyama et al., "Low temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench" p. 705-711

には、深海から単離された、好気性、グラム陰性、非運動性、非孢子形成性、及びオキシダーゼ陽性で *Moraxella*-*Psychrobacter* group であると考えられる低温細菌が記載されているから、上記請求の範囲に記載された発明と文献1に記載された発明とは同一であると認められ、上記請求の範囲に記載された発明は新規性を有さない。

請求の範囲1-7

文献2: Applied and Environmental Microbiology, 63(8), Aug. 1997

John P. Bowman et al., "Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice", p. 3068-3078

文献3: International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4), Oct. 1996,

John P. Bowman et al., "Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils", p. 841-848

文献2には、*Psychrobacter glacincola*, *Psychrobacter immobilis*、文献3には、*Psychrobacter immobilis*, *Psychrobacter uratovorans*, *Psychrobacter frigidicola*, *Psychrobacter phenylpyruvicus* の16S rDNAの配列が記載されている。また、ある生物種における公知の配列からプローブを作製し、該プローブを用いて該生物の類縁の生物種における対応する配列を取得することは本出願時当該分野において周知技術である。そうすると、文献1に記載された低温細菌の16S rDNAの取得を目的に、文献2及び3に記載された *Psychrobacter* 属各種に上記周知技術を適用し、同じく *Moraxella*-*Psychrobacter* group と考えられる微生物の16S rDNAを得ることは当業者にとって自明のことである。また、類縁種の全長の塩基配列を比較し、保存性の高い領域を選びプローブとすることも当業者にとって自明のことである。そして、上記請求の範囲に記載された発明が文献1-3及び周知技術から予測される以上の格別の効果を奏するものとも認められない。したがって、上記請求の範囲に記載された発明は進歩性を有さない。

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

工業技術院生命工学工業技術研究所長
大箸 信一

寄託者

あ て 名 丁

殿

茨城県つくば市東1丁目1番3

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) P2K6	(受託番号) FERM BP- 7106
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 <input checked="" type="checkbox"/> 科学的性質 <input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 11 年 5 月 21 日 (原寄託日) に受領した1 欄の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、平成 11 年 5 月 21 日 (原寄託日) に1 欄の微生物を受領した。 そして、平成 12 年 3 月 28 日 に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。 (平成 11 年 5 月 21 日 に寄託された微工研菌寄第P- 17393 号より移管)	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所	
National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology	
名 称: 所 長 大箸 信一 Dr. Shinichi Oshichi Director-General	
あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-8566) 1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305-8566, JAPAN	
平成12年(2000) 3月29日	

(特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約)

受領 科学的性質及び分類学上の位置の表示等の届出書

2000 5.19

平成12年5月18日

工業技術院生命工学工業技術研究所長 殿

寄託者様と微生物についての科学的性質及び分類学上の位置を届けます。

I. 微生物の表示		
(識別のための表示) P2K6	(受託番号) FERM BP- 7106	
II. 科学的性質及び分類学上の位置		
	直近時の表示内容	修正又は表示する内容
<input type="checkbox"/> 科学的性質		
<input checked="" type="checkbox"/> 分類学上の位置	Domain : <u>Bacteria</u> <u>α-Proteobacteria</u> Family : <u>Moraxellaceae</u> Genus : <u>Psychrobacter</u> Species : <u>pacificus</u>	Species : <u>pacificensis</u>
III. その他の情報		
IV. 証明の請求		
この届出に関する証明書の交付を、 <input type="checkbox"/> 請求します。 <input type="checkbox"/> 請求しません。		

V. 寄託者

氏名(名称)

あて名

VI. 代理人

氏名(名称)

あて名

工業技術院 生命工学工業技術研究所長 大箸 信一
 KOUGYOUGIJUTSUIN SEIMEIKOUGAKUKOUGYOUGIJUTSUKENIGYOSHO
 OHASHI SHINICHI
 SHINICHI OHASHI: Director-General National Institute of
 Bioscience and Human-Technology
 茨城県つくば市東1丁目1番3
 Ibaraki-ken Tsukuba-shi Higashi 1-1-3

◎添付書類の目録

- ☐ 手数料納付書
☐ 科学的性質及び分類学上の位置に関する追加の情報を記載した書面
☐ その他の情報について追加の情報を記載した書面
☐ 委任状
☐ (

1 通

1 通

1 通

通

通)

FORM No.4 (ARTICLE 12 RELATED)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE
DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE
SUBMISSION OF A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION
TO Director General of National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial
Science and Technology

The depositor submits a scientific description and/or proposed taxonomic position of the following microorganism.

I. IDENTIFICATION OF MICROORGANISM		
(Identification Reference) <div style="text-align: center;">P2K6</div>	(Accession Number) <div style="text-align: center;">FERM BP-7106</div>	
II. A SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC POSITION		
	Latest Descriptions	Amended or New Descriptions
<input type="checkbox"/> A Scientific Property		
<input checked="" type="checkbox"/> Taxonomic Position	Domain: <i>Bacteria</i> γ - <i>Proteobacteria</i> Family: <i>Moraxellaceae</i> Genus: <i>Psychrobacter</i> Species: <i>pacificus</i>	Species: <i>pacificensis</i>
III. OTHER INFORMATION		
IV. REQUEST FOR CERTIFICATION		
Delivery of certification relating to this submission is <input type="checkbox"/> required. <div style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> not required.</div>		

V. Depositor

Name: Dr. Shinichi OHASHI, Director-General of
National Institute of Bioscience and Human Technology
Agency of Industrial Science and Technology (sealed)

Address: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8566
Japan

VI. Agent

Name:

Address:

© List of Appendices

- | | |
|--|--------|
| <input type="checkbox"/> Fee payment sheet | 1sheet |
| <input type="checkbox"/> Document describing additional information on a scientific description and/or proposed taxonomic position | 1sheet |
| <input type="checkbox"/> Document describing additional other information | 1sheet |
| <input type="checkbox"/> Power of Attorney | sheet |
| <input type="checkbox"/> (| sheet) |

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000年11月30日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/71705 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 1/20

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03372

(22) 国際出願日: 2000年5月25日 (25.05.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平11/145342 1999年5月25日 (25.05.1999) JP
特願平 PCT/JP00/02045
2000年3月30日 (30.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術
院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SEC-
RETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千
代田区霞が関一丁目3番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山明彦

(MARUYAMA, Akihiko) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県
つくば市吾妻2-817-2 Ibaraki (JP). 北村恵子 (KITA-
MURA, Keiko) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県つくば
市稲荷前24-33 Ibaraki (JP). 倉根隆一郎 (KURANE,
Ryuichiro) [JP/JP]; 〒270-0031 千葉県松戸市新松戸
7-253 Chiba (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5
森ビル3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, NO, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PSYCHROTROPHIC BACTERIUM AND DNA PROBE FOR DETECTING THE BACTERIUM

(54) 発明の名称: 新規低温細菌および該細菌を検出するためのDNAプローブ

(57) Abstract: A technique for species-specifically detecting a microorganism and its analog based on the characteristics of the genetic information of a microbial species inhabiting inherently in the deep sea. 16S rDNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:1; an oligonucleotide probe containing a part of the base sequence of SEQ ID NO:1; and a method for specifically detecting or identifying a bacterium belonging to (*Psychrobacter pacificensis*) by using this probe. Use of the above oligonucleotide probe makes it possible to highly sensitively and accurately detect (*Psychrobacter pacificensis*) at the molecular or cellular level as an indication organism useful in understanding the circulation of the deep-layer sea water.

(57) 要約:

本発明は、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。本発明は、配列番号1の塩基配列を有する16S rDNA。配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに該プローブを用いて、*Psychrobacter pacificensis*に属する細菌を特異的に検出または同定する方法を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドプローブにより、深層海水の循環を知る上で有用な指標生物としての*Psychrobacter pacificensis*を分子・細胞レベルで高感度、高精度に検出できる。

WO 00/71705 A1

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2000 年 11 月 30 日 (30.11.2000)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 00/71705 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 1/20

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/03372

(22) 国際出願日: 2000 年 5 月 25 日 (25.05.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/145342 1999 年 5 月 25 日 (25.05.1999) JP
特願平 PCT/JP00/02045
2000 年 3 月 30 日 (30.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 工業技術
院長が代表する日本国 (JAPAN as represented by SEC-
RETARY OF AGENCY OF INDUSTRIAL SCIENCE
AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒100-8921 東京都千
代田区霞が関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山明彦

(MARUYAMA, Akihiko) [JP/JP]; 〒305-0031 茨城県
つくば市吾妻 2-817-2 Ibaraki (JP). 北村恵子 (KITA-
MURA, Keiko) [JP/JP]; 〒305-0061 茨城県つくば
市稲荷前 24-33 Ibaraki (JP). 倉根隆一郎 (KURANE,
Ryuichiro) [JP/JP]; 〒270-0031 千葉県松戸市新松戸
7-253 Chiba (JP).

(74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒
105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5
森ビル 3F Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, JP, NO, NZ, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE,
DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PSYCHROTROPHIC BACTERIUM AND DNA PROBE FOR DETECTING THE BACTERIUM

(54) 発明の名称: 新規低温細菌および該細菌を検出するための DNA プローブ

(57) Abstract: A technique for species-specifically detecting a microorganism and its analog based on the characteristics of the genetic information of a microbial species inhabiting inherently in the deep sea. 16S rDNA having the base sequence represented by SEQ ID NO:1; an oligonucleotide probe containing a part of the base sequence of SEQ ID NO:1; and a method for specifically detecting or identifying a bacterium belonging to (*Psychrobacter pacificensis*) by using this probe. Use of the above oligonucleotide probe makes it possible to highly sensitively and accurately detect (*Psychrobacter pacificensis*) at the molecular or cellular level as an indication organism useful in understanding the circulation of the deep-layer sea water.

(57) 要約:

本発明は、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。本発明は、配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA。配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ、ならびに該プローブを用いて、*Psychrobacter pacificensis* に属する細菌を特異的に検出または同定する方法を提供する。本発明のオリゴヌクレオチドプローブにより、深層海水の循環を知る上で有用な指標生物としての *Psychrobacter pacificensis* を分子・細胞レベルで高感度、高精度に検出できる。

WO 00/71705 A1

明 細 書

新規低温細菌および該細菌を検出するためのDNAプローブ

5 技術分野

本発明は、深海微生物を指標とした深海水の循環やその湧昇のモニタリングの技術に関し、より詳細には、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glaci
ncolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を種特異的に検出す
る技術、ならびにPsychrobacter pacificensisに属する細菌を種特異的に検出す
10 る技術に関する。さらに、本発明は、深海水の循環やその湧昇のモニタリングの
指標とし得る深海微生物に関し、より詳細には、Psychrobacter pacificensisに
属する細菌に関する。

背景技術

日本近海の深海水は、グリーンランド沖で沈み込んだ密度の高い海水に端を発
15 し、さらに南極海周辺での高密度海水の加入を経て日本海溝をはじめとする北太
平洋海域へ流れ込む海洋大循環流により供給されていると推測されている。この
ような深海水は豊富な栄養塩類を含んでおり、湧昇海域では高い生物生産活動が
見られるため、これを利用した深海水の利用が現在検討されている。

また、これまで利用されていなかった深海魚が、食料、餌料として用いられは
20 じめている。

さらに、地球規模や地域規模での環境汚染問題に関連し、人間活動の結果放出
または廃棄される二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等を日本近海の深海域
に投棄することが検討されている。

しかし、これら深海水や深海域に関する知見が不足しているため、深海水が表
25 層の生物活動に及ぼす影響の評価や二酸化炭素や放射性廃棄物、産業廃棄物等の
深海投棄が深海の生物活動に及ぼす影響の評価が困難な状況にある。また、グロ
ーバルな深層海水の循環を知る上で有用な指標生物の報告もない。

発明の開示

本発明は、深海水や深海域を人為的に利用するにあたって生物学的な安全性評

価を行う技術、具体的には、深海に固有に生息する微生物種の遺伝情報の特徴に基づき、該微生物およびその近縁種を種特異的に検出する技術の提供を目的とする。

本発明者らは、日本海溝深海水由来の新規低温細菌種の16S rRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき、本微生物を分子・細胞レベルにおいて特異的に検出することとを可能にするオリゴヌクレオチドプローブを開発して、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAを提供する。

また、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを提供する。オリゴヌクレオチドプローブはRNAプローブまたはDNAプローブのいずれであってもよい。配列番号1の塩基配列の一部としては配列番号2の塩基配列を挙げることができる。上記のプローブは、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するために使用することができる。また、上記のプローブは、Psychrobacter pacificensisに属する細菌を特異的に検出または同定するために使用することもできる。

さらに、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法を提供する。

さらに、本発明は、配列番号1の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificensisに属する細菌を特異的に検出または同定する方法を提供する。

また、本発明は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とするPsychrobacter pacificensisも提供する。Psychrobacter pacificensisとしては、例えば、Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6 (FERM BP-7106)を挙げることができる。

本明細書は、本願において主張する優先権の基礎である日本国特許出願第11-

145342号及び国際出願第PCT/JP00/02045号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

配列表の説明

- 配列番号 2 : 合成 DNA (プローブ Psypac469-487)
- 5 配列番号 3 : 合成 DNA (プライマー 359f)
- 配列番号 4 : 合成 DNA (プライマー 803r)
- 配列番号 5 : 合成 DNA (プライマー 821f)
- 配列番号 6 : 合成 DNA (プライマー 1104r)
- 配列番号 7 : 合成 DNA (プライマー 1111f)
- 10 配列番号 8 : 合成 DNA (プローブ Eub338-355)
- 配列番号 9 : 合成 DNA (プローブ Cont)
- 配列番号 10 : 合成 DNA (プローブ Univ1390-1407)

発明を実施するための最良の形態

- 本発明の新種の微生物、Psychrobacter pacificensisは、八丈島沖の日本海溝
- 15 水深6,000mの海水より、1気圧摂氏4度の低温培養条件下で優占的に出現した従属栄養性微生物である。Psychrobacter pacificensisとしては、NIBH P2J2、NIBH P2J3、NIBH P2J13、NIBH P2K6、NIBH P2K17およびNIBH P2K18の6種の株が本発明者らにより単離されている。なお、該微生物は、当初、本発明者らによりPsychrobacter pacificusと命名されたが、その後、Psychrobacter
- 20 pacificensisに名称変更されて新種登録されている (Maruyama et al., Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species Psychrobacter pacificensis sp. nov., Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 50 (2000) 835-846)。従って、上記Psychrobacter pacificusとPsychrobacter pacificensisとは、全く同一
- 25 の微生物群を意味する。

上記菌株のうち、NIBH P2J3、NIBH P2K6およびNIBH P2K18の分類学的性質を以下の表1、2および3にまとめる。なお、表1、2および3には、同時に単離された他の菌株や本菌の近縁種についても分類学的性質が記載されている。

表 1

日本海溝表層海水および深海水由来の低温細菌の運動性および細胞外器官

5	Strain	Motility test ¹ (microscopic)	Motility test ² (agar plate)	Extracellular organ ³	Phylogenetic location
10	Surface seawater				
	P1H8	-	-	Flagella*	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H13	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H14	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H22	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H25	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
15	Deep seawater				
	P2J2	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2J3	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2J13	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2K6	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2K17	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2K18	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>

1 : ノマルスキー光学系を用いた光学顕微鏡下。 2 : 栄養素勾配を有する半固形寒天培地上。 3 : 電子顕微鏡観察による。 - : 陰性。 Flagella* : 鞭毛付着が時折観察された。 w:弱い、びくつとした動き。

表 2

サイクロバクター・パシフィセンスおよび近縁種の表現型の特徴と GC 含量

Characteristics ^a	<i>Psychrobacter pacificensis</i>				<i>Psychrobacter immobilis</i> ^b	<i>Psychrobacter uralivorans</i> ^b	<i>Psychrobacter frigidicola</i> ^b	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	<i>Psychrobacter glaciicola</i>	
	NIBH strain no.			Summary	(Phenon 1)	(Phenon 2)	(Phenon 3)	phenylpyruvicus ACAM 535 ^b	glaciicola ACAM 483 ^c	
	P2J3	P2K6	P2K18							
5	Urease activity	+	+	+	+	v+	v+	-	+	v-
	Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	Tryptophan deaminase	-	-	-	-	v-	-	+	-	-
	Nitrate reduction	-	-	-	-	v-	v-	-	-	v+
	Growth in NaCl (%):									
	0	w	-	-	-	+	+	+	?	+
	1	+	-	-	-v	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	Growth at (°C):									
	30	+	+	+	+	+	-	-	+	-
	35	+	w	+	+	v+	-	-	+	-
	40	-	-	-	-					
	Acid production from:									
	Glucose	+	w	+	+					-
	Xylose	+	w	+	+	+	-	-	-	-
	Arabinose	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	*Others ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	PNPG test ^d	-	-	-	-					
	Use as sole carbon and energy sources:									
	Acetate	+	-	-	-v	+	v+	+	+	+
	L-alanine	+	-	-	-v	+	-	-	+	v+
	p-hydroxy-benzoate	-	-	-	-	-	v-	-	-	?
	3-hydroxy-butyrate	+	-	+	+	+	+	-	+	v+
	Citrate	-	-	-	-	v-	-	-	+	v+
	Gluconate ^d	-	-	-	-	v-	-	-	-	-
	L-histidine	+	+	+	+	+	-	-	-	v+
	Lactate	+	-	+	+	+	v+ (DL)	- (DL)	+	v+ (DL)
20	DL-malate ^d	+	+	+	+	+	v+ (L)	+	+	- (L)
	Malonate	-	+	-	-v	-	-	-	-	-
	Propionate	-	-	-	-	v+	-	-	+	+
	L-serine	-	-	-	-	-	v-	-	-	-
	Suberate	+	-	-	-v	v-	-	+	-	?
	n-valerate	-	-	-	-	+	v+	+	+	+
	**Others	-	-	-	-					
	DNA G+C content (mol %)	44	44	45	44-45	44-47	44-46	41-42	43	43-44

- 25 a) 全ての種および菌株は、オキシダーゼ、カタラーゼ、4~15℃における増殖、6.5% NaClに対する耐性、ならびに唯一の炭素およびエネルギー源としてのL-プロリンの利用について陽性であった。b) Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848のデータ。c) Bowman et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215のデータ。d) API 20 NEテストによって決定し

た。化合物の利用性はAPI ID 32 GNテストを用いて推定した。PNPGテスト：
 パラ-ニトロフェニル- (β) -D-ガラクトピラノシドを用いた β -ガラクトシ
 ダーゼについてのテスト。

*その他：グルコース発酵、インドール産生、エスクリンの加水分解、ゼラチン

5 の加水分解、およびアルギニンジヒドロラーゼ。^(d)

**その他：N-アセチル-D-グルコサミン、m-ヒドロキシ-ベンゾエート、グリコー
 ゲン、酢酸フェニル。以下の炭素およびエネルギー源は、いずれの種または菌株

10 によっても利用されなかった：N-アセチルグルコサミン、アジピン酸、L-アラ
 ビノース、カプリン酸、L-フコース、2-ケト-グルコネート、5-ケト-グルコネー
 ト、(D)グルコース、(ミオ)イノシトール、イタコン酸、マルトース、D-マン
 ニトール、D-メリビオース、(L)ラムノース、D-リボース、(D)サリシン、D-ソ
 ルビトール、スクロース。なお()はBowmanら(1996)が用いた基質の型を示す。

表中の利用の記載において、()は光学異性体の型を示す。表中のサイクロバク
 ター・パシフィセンシスの欄における陽性菌株の頻度：+, 100%; +v, 67%; -v,
 15 33%; -, 0%。他のサイクロバクター種の欄における陽性菌株の頻度：+, 100-9
 0%; v+, 89-11%; v-, 10-0%。w：弱い反応。

NIBH P2K6菌株は、サイクロバクター・パシフィセンシスの基準株であると規
 定された。

表 3

サイクロバクター・パシフィセシスの脂肪酸組成および主要キノン型

Composition	<i>Psychrobacter pacificensis</i>			Average content	<i>Psychrobacter</i>	
	NIBH strain no.				<i>immobilis</i>	
	P2J3	P2K6*	P2K18		ATCC 43116	
5	Fatty acid:					
	10:0	1.3	Tr	1.2	0.8 (0.7)	0.9
	11:0	0.1	Tr	0.2	0.1 (0.1)	Tr
	12:0	2.2	0.8	2.3	1.8 (0.8)	Tr
	14:0	0.7	0.6	0.5	0.6 (0.1)	0.3
	14:1 (X1)	0.1	0.2	Tr	0.1 (0.1)	0.1
	15:0	0.4	Tr	0.4	0.3 (0.2)	0.2
	16:0	7.3	8.7	6.5	7.5 (1.1)	4.3
10	16:1 (w7c)	9.7	15.8	6.6	10.7 (4.7)	3.8
	16:1 (X2)	0.4	0.4	0.3	0.4 (0.1)	0.4
	17:0	2.7	5.6	4.8	4.4 (1.5)	4.2
	i17:0	0.6	Tr	0.4	0.3 (0.3)	Tr
	17:1 (X3)	5.1	1.5	5.1	3.9 (2.1)	6.8
	18:0	9.4	5.6	13.1	9.4 (3.8)	8.0
	18:1 (w7c)	1.2	0.8	0.7	0.9 (0.3)	0.8
15	18:1 (w9c)	50.1	52.8	50.9	51.3 (1.4)	63.1
	18:2	3.4	2.4	1.8	2.5 (0.8)	3.5
	19:0	0.4	0.4	0.6	0.5 (0.1)	0.9
	20:0	Tr	Tr	Tr	Tr	0.1
	Total	95.1	95.6	95.4	95.5	97.4
	Total unsaturated	70.0	73.9	65.4	69.8	75.0
	Hydroxy fatty acid:					
20	3-OH 12:0	4.1	3.6	3.9	3.9 (0.3)	2.2
	3-OH 14:0	0.8	0.8	0.7	0.8 (0.1)	0.4
	Total	4.9	4.4	4.6	4.6 (0.3)	2.6
	Major quinone type	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8

X1-3: 正確な二重結合の位置は決定されていない。Tr: ごく微量(<0.1%)。

かっこ内の数字は標準偏差を示す(n=3)。*: 基準株。

- 25 *Psychrobacter pacificensis*は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非胞子形成性、オキシダーゼ陽性の長さ1.0-1.5 μm 、幅約1 μm の球桿菌である。これらの菌株は細胞外器官として多数のフィムブリエ（纖毛）を生ずるが、鞭毛は生じない。ポリペプトンおよび酵母抽出物を含む寒天プレート上に、縁が欠けていない円形で凸状の、色がオフホワイトのコロニーを形成する。蛍光色素は全

- く形成されない。至適増殖には海水または約3%のNaClを必要とするが、殆どの菌株はNaCl濃度が0または8%以上の場合は増殖しない。4℃では定常期に達するのに1~2週間を要するが、これらの菌株は4℃で20℃における増殖収率(growth yield)に匹敵する増殖収率を示す。約25℃で至適増殖が起こり、限界増殖温度は38℃である。グルコース、キシロースおよびアラビノースから酸が好氣的に形成される。これらの菌株はウレアーゼ活性が陽性であるが、フェニルアラニンデアミナーゼおよびトリプトファンデアミナーゼについては陰性である。この種はグルコース発酵、インドール産生、エスクリン加水分解、ゼラチン加水分解およびアルギニンジヒドロラーゼという生化学試験について陰性である。この種は唯一の炭素およびエネルギー源としてL-ヒスチジンおよびDL-リンゴ酸を利用する。いくつかの菌株は酢酸、L-アラニン、3-ヒドロキシ-ブチレート、乳酸、マロン酸およびスベリン酸を利用するが、p-ヒドロキシ-ベンゾエート、クエン酸、グルコン酸、プロピオン酸、L-セリンまたはn-吉草酸を利用する菌株はない。18:1w9cが主要な脂肪酸であり、またQ8が主要なキノンである。DNA G+C含有量は、HPLCで測定すると43~44モル%である。基準株は、日本国八丈島沖日本海溝の深度6,000 mの海水から4℃で単離したNIBH P2K6である。この菌株は、財団法人醗酵研究所に寄託されている(IFO 16270)。また、Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6 (IFO 16270) は工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に平成11年5月21日付けで寄託された(受託番号:FERM BP-7106)。

- Psychrobacter pacificensisは新種であり(Maruyama et al., Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species Psychrobacter pacificensis sp. nov., Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 50 (2000) 835-846)、その近縁種は南極域で多数分離されている(Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848, Bowman et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215)ことから、グローバルな深層海水の循環に関連した指標生物として有用であることがわかる。グローバルな深層海水の循環については、太平洋海域では定常的に南極から日本海溝に向け深層海水が流れていることが知られている(Stommel,

H.(1958) Deep-Sea Res. 5:80-82).

本発明の新菌種である Psychrobacter pacificensis は、上述のように、深層水および深海域の新規な指標生物であり、従って、様々な目的において深層水および深海域のモニタリング技術に有用である。最近、深層水が富栄養性、低水温性、
5 清浄性などの資源的価値を有する再生循環型の大型資源として注目されており（「海洋深層水の資源的価値とその利用」、月刊海洋、Vol.26, No.3, 133-138, 1994）、例えば、水産分野では、餌料性プランクトンの培養、海藻培養、冷水性海産動物飼育、深海性生物飼育などが研究されている。また、エネルギー分野では、水温制御、冷房、淡水生産などが試みられている。このような深層水を資源
10 として利用するためには、深層水を評価するための生物モニタリング技術が不可欠となる。さらに、Psychrobacter pacificensis は、産業廃棄物の深海域への廃棄処理に関連する深層水のモニタリング、深海魚の利用に関わる深海微生物のモニタリング、深層海水の地球規模での循環調査、深海水の湧昇域のモニタリング等において、有用な指標生物である。

15 また、Psychrobacter pacificensis は、有用物質を生産する微生物である可能性があり、例えば、キチン分解酵素（Bioindustry, 3月号, 5-12, 1998, シーエムシー）、低温で活性のある低温性リパーゼやプロテアーゼ（洗剤として利用できる）等（東原孝規、「海洋微生物とバイオテクノロジー」清水潮編、技報堂出版、pp. 51-67, 1991）（Ohgiya et al., In: Biotechnological Application of Cold-adapted O
20 rganisms. Edited by R. Margesin and F. Schinner, Springer, pp. 17-34, 1999）、EPA、DHA等（Appl. Environ. Microbiol., 51, 730-737, 1986）の有用脂肪酸を含有する脂質等の微生物生産に利用しうる。

配列番号1の塩基配列を有する16S rDNAは、Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6から得られる。すなわち、Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6
25 の菌体から標準的な方法によりゲノムDNAを抽出し、適切なプライマーを用いて16S rDNAをPCRにより増幅する（Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons）。PCR産物から過剰なプライマーおよびdNTPを除去した後、適切なプライ

マーを用いるサイクルシーケンス法により、精製PCR産物の配列を直接決定することができる。その配列を配列番号1に示す。

- Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6の16S rRNA遺伝子の塩基配列情報に基づき、本菌に特異的な塩基配列領域を抽出し、分子・細胞レベルでの検出を可能にするDNAプローブを作製する。本菌に特異的な塩基配列領域としては、配列番号1の塩基配列の塩基番号458～476の領域(大腸菌の配列に準じた場合は、塩基番号469～487の領域)などを挙げるることができる。この領域に対応する塩基長10～50bp、好ましくは塩基長15～25bpのプローブを作製するとよい。好ましい一例として、以下の塩基配列を有するプローブを挙げるることができる。
- 10 ・5'TAATGTCATCGTCCCCGGG3'(配列番号2)

プローブは、ホスホルアミド法(Beacage and Carruthers, Tetrahedron Lett. 22:1859-1862 (1981))またはトリエステル法(Matteucci et al., J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981))により合成することができる。あるいは、自動合成装置を使用してプローブを合成してもよい。

- 15 さらに、プローブは、アイソトープ、蛍光色素、DIG(ジゴキシゲニン)などで標識するとよい。標識としては、Cy5(インドジカルボシアニン)やTRITC(テトラメチルローダミンイソチオシアネート)、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)等の蛍光色素やDIG(ジゴキシゲニン)等のハプテンを挙げるることができる。
- 20 本発明のプローブを用いて、種々のハイブリダイゼーション法(サザンブロット法、ノーザンブロット法、コロニーハイブリダイゼーション、in situハイブリダイゼーション(例えば、FISH)など)により、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種を検出または同定することができる。Psychrobacter pacificensisおよびPsychrobacter glacincolaの近縁種として、データベース上に記載されているが同定根拠が不明なPsychrobacter glacincola (AFO25555、PGU85879、PGU85878、PGU85877、PGU85876)、Psychrobacter immobilis (PIU85880)、Psychrobacter sp. (PSU85874)等の菌株を挙げるることができる。また、上述のような方法により、Psychrobacter pacificensisに属する細菌を種特異的に検出または同定することもできる。
- 25

配列番号2の塩基配列のプロープを用いて、Psychrobacter pacificensisを検出または同定する方法の一例について、以下に説明する。

- パラフォルムアルデヒド等を用いて固定した微生物試料を、ゼラチン等有機被膜を形成させたスライドガラス上に塗抹し、微生物細胞をスライドガラスの有機被膜上に不動化する。エタノールで脱水、または微生物細胞を室温で一晩程乾燥させた後、微生物のゲノムDNAおよびRNAと該DNAプロープとの間でハイブリダイゼーションを行い、洗浄処理により遊離または不完全結合DNAプロープを除去する。ここで、ハイブリダイゼーションの条件は特に限定されないが、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種を検出または同定する場合には、1～2個のミスマッチを許す比較的穏和な条件で、好ましくは、フォルムアミドを添加しない40～46℃で4時間以上の条件であり、Psychrobacter pacificensisに属する細菌を種特異的に検出または同定する場合には、1個のミスマッチをも許さない厳格な条件で、好ましくは、30～40%程度のフォルムアミド存在下44～48℃で4時間以上の条件である。通常
- 15 の蛍光顕微鏡観察手法に準じて微生物細胞を観察し、対象とする微生物細胞に相補結合した蛍光標識DNAプロープの蛍光を検出する。コントロールとして、非特異的なDNAプロープや対象とする微生物属種外の微生物を用い、上記実験を行う。対象とした微生物がDNAプロープで標的とした微生物であった場合は、細胞内核酸と該DNAプロープとの相補結合により細胞全体が蛍光を発するので
- 20 検出、同定ができる。

本発明のプロープは、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種の種特異的な検出、ならびにPsychrobacter pacificensisに属する細菌の種特異的な検出を可能にするばかりでなく、検出の迅速化と精度向上をもたらす点でも非常に有益である。

- 25 本発明を以下の実施例により具体的に説明する。これらの実施例は説明のためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例1

Psychrobacter pacificensis菌株の単離と16S rRNA遺伝子の配列決定

日本海溝の表層および深海環境から単離した67菌株より全部で16菌株を選択

した。このうち、11菌株をモラキセラ菌に類似した細菌であると仮に同定した。異なる寒天培地、例えばポリペプトンおよび酵母抽出物を含有する人工海水に基づく1/2 TZ (Maruyama, A et al., (1993) J. Oceanogr. 49, 353-367)、Marine Agar (Difco; Detroit, MI, USA) およびNitritient Agar (Difco) 等を用いてこれらの菌株を純化した。各菌株を20℃でインキュベートして集菌し、ゲノムDNAを得た。0.3%の寒天を含む1/2 TZ半固形寒天培地を4℃での保存のために用いた。ガラス試験管に封入した乾燥菌体もまた長期保存のために4℃で保存した。

深海水から単離したモラキセラ菌に類似した菌株について、下記の直接配列決定によって16S rRNA遺伝子を決定した。すなわち、菌体を遠心により集菌し、洗淨し、そしてTE緩衝液(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8.0)に再懸濁した。セチルトリメチルアンモニウムブロミド(CTAB)、フェノール、およびクロロホルム/イソアミルアルコール(Murray, M.G. et al., (1980) Nucleic Acids Res 8, 4321-4325)を用いて標準的方法によってゲノムDNAを抽出した。ほぼ完全な16S rRNA遺伝子を得るため、プライマー27f および1525r (Lane, D.L. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics, pp.115-175. Edited by E. Stackebrandt, M. Goodfellow. West Sussex: John Wiley & Sons)ならびに文献(Maruyama, A. et al., (1997) Mar. Biol 128, 705-711)に記載のPCRサイクルを用いて、Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, Conn., USA) によってPCRを実施した。SUPREC-02(宝酒造)を用いてPCR産物から過剰なプライマーおよびdNTPを除去した。自動DNAシーケンサー(ALFred; Pharmacia LKB, Sweden)を用いて、適切なフォワードおよびリバースプライマー(Lane, D.L. (1991)、上記)を用いて、製造者の指示に従って、サイクルシーケンス法により精製PCR産物を直接配列決定した。具体的には、上記プライマーは大腸菌番号系における342r、359f (5'-TCC TAC GGG AGG CAG CAG TG (配列番号3); 20量体)、519r、803r (5'-CAT CGT TTA CGG CGT GGA C (配列番号4); 19量体)、821f (5'-GTC CAC GCC GTA AAC GAT G (配列番号5); 19量体)、1104r (5'-TTG CGC TCG TTG CGG GAC (配列番号6); 18量体)、お

- よび1111f (5'-GTC CCG CAA CGA GCG CAA (配列番号7); 18量体)である。各16S rDNA領域断片の配列を両方の鎖について決定し、GENETYX ソフトウェア (バージョン8; ソフトウェア開発株式会社) を用いて連結した。モラキセラ菌に類似した深海の菌株を除いて、標準種モラキセラ・ラクナータ菌 (*Moraxella lacunata*) ATCC 17967を含む他の細菌の16S rDNAを以前に記述された (Maruyama, A. et al., (1997)上記) ように抽出し、増幅し、サブクローン化した。CLUSTAL W (バージョン1.71; 44) 中の多重アラインメントプログラムを用いて配列を並べた。CLUSTAL W プロファイルアラインメントオプションを用いて、我々が決定した配列をアントワープ大学 (University of Antwerp) のrRNA wwwサーバー ([http://rrna,uia,ac,be/](http://rrna.uia.ac.be/);45) から得た公知の並置させた配列に合わせた。この並置したデータマトリックスから、空隙 (gap) があるすべての位置、すなわち未決定および曖昧な配列を除去した。 *Psychrobacter pacificensis* NIBH P2K6の16S rRNA遺伝子の配列を配列番号1に示す。

実施例 2

- 15 *Psychrobacter pacificensis* の分類学的性質
- 実施例 1 に記載したように、 *Psychrobacter pacificensis* は、八丈島沖の日本海溝水深6,000mの海水より、1気圧摂氏4度の低温培養条件下で優占的に出現した従属栄養性微生物である。 *Psychrobacter pacificensis* としては、NIBH P2J2、NIBH P2J3、NIBH P2J13、NIBH P2K6、NIBH P2K17およびNIBH P2K18
- 20 の6種の株が本発明者らにより単離されている。
- 上記菌株のうち、NIBH P2J3、NIBH P2K6およびNIBH P2K18の分類学的性質を常法に従って調べた。その結果を、以下の表4、5および6にまとめる。なお、表4、5および6には、同時に単離された他の菌株や本菌の近縁種についても分類学的性質が記載されている。

表 4

日本海溝表層海水および深海水由来の低温細菌の運動性および細胞外器官

	Strain	Motility test ¹ (microscopic)	Motility test ² (agar plate)	Extracellular organ ³	Phylogenetic location
5	Surface seawater				
	P1H8	-	-	Flagella*	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H13	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H14	-	-	None	<i>Halomonadaceae</i>
	P1H22	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
10	P1H25	+	+	Flagella	<i>Halomonadaceae</i>
	Deep seawater				
	P2J2	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2J3	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2J13	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2K6	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
15	P2K17	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>
	P2K18	-/w	-	Fimbriae	<i>Moraxellaceae</i>

1 : ノマルスキー光学系を用いた光学顕微鏡下。2 : 栄養素勾配を有する半固形寒天培地上。3 : 電子顕微鏡観察による。- : 陰性。Flagella* : 鞭毛付着が時折観察された。w:弱い、びくつとした動き。

表 5

サイクロバクター・バシフィセンスおよび近縁種の表現型の特徴と GC 含量

Characteristics ^a	<i>Psychrobacter pacificensis</i>				<i>Psychrobacter immobilis</i> ^b	<i>Psychrobacter urativorans</i> ^b	<i>Psychrobacter frigidicola</i> ^b	<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i>	<i>Psychrobacter glaciicola</i>
	NIBH strain no.				(Phenon 1)	(Phenon 2)	(Phenon 3)	ACAM 535 ^b	ACAM 483 ^c
	P2J3	P2K6	P2K18	Summary					
5									
Urease activity	+	+	+	+	v+	v+	-	+	v-
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	v-	-	+	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	v-	v-	-	-	v+
Growth in NaCl (%):									
0	w	-	-	-	+	+	+	?	+
1	+	-	-	-v	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	+	+	+	+	+
10									
Growth at (°C):									
30	+	+	+	+	+	-	-	+	-
35	+	w	+	+	v+	-	-	+	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from:									
Glucose	+	w	+	+	+	-	-	-	-
Xylose	+	w	+	+	+	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	-	-	-	-
*Others ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15									
PNPG test ^d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Use as sole carbon and energy sources:									
Acetate	+	-	-	-v	+	v+	+	+	+
L-alanine	+	-	-	-v	+	-	-	+	v+
p-hydroxy-benzoate	-	-	-	-	-	v-	-	-	?
3-hydroxy-butyrate	+	-	+	+v	+	+	-	+	v+
Citrate	-	-	-	-	v-	-	-	+	v+
Gluconate ^d	-	-	-	-	v-	-	-	-	-
L-histidine	+	+	+	+	+	-	-	-	v+
Lactate	+	-	+	+v	+(DL)	v+(DL)	-(DL)	+(DL)	v+(DL)
20									
DL-malate ^d	+	+	+	+	+(L)	v+(L)	+(L)	+(L)	-(L)
Malonate	-	+	-	-v	-	-	-	-	-
Propionate	-	-	-	-	v+	-	-	+	+
L-serine	-	-	-	-	-	v-	-	-	-
Suberate	+	-	-	-v	v-	-	+	-	?
n-valerate	-	-	-	-	+	v+	+	+	+
**Others	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNA G+C content (mol %)	44	44	45	44-45	44-47	44-46	41-42	43	43-44

- 25 a) 全ての種および菌株は、オキシダーゼ、カタラーゼ、4～15℃における増殖、6.5% NaClに対する耐性、ならびに唯一の炭素およびエネルギー源としてのL-プロリンの利用について陽性であった。b) Bowman et al., (1996) Int. J. Syst. Bacteriol. 46:841-848のデータ。c) Bowman et al., (1997) System. Appl. Microbiol. 20:209-215のデータ。d) API 20 NEテストによって決定し

た。16菌物の利用性はAPI ID 32 GNテストを用いて推定した。...

パラ-ニトロフェニル- (β) -D-ガラクトピラノシドを用いたβ-ガラクトシダーゼについてのテスト。

*その他：グルコース発酵、インドール産生、エスクリンの加水分解、ゼラチン

5 の加水分解、およびアルギニンジヒドロラーゼ。^d

**その他：N-アセチル-D-グルコサミン、m-ヒドロキシ-ベンゾエート、グリコーゲン、酢酸フェニル。以下の炭素およびエネルギー源は、いずれの種または菌株によっても利用されなかった：N-アセチルグルコサミン、アジピン酸、L-アラビノース、カプリン酸、L-フコース、2-ケト-グルコネート、5-ケト-グルコネート、

10 ト、(D)グルコース、(ミオ)イノシトール、イタコン酸、マルトース、D-マンニトール、D-メリビオース、(L)ラムノース、D-リボース、(D)サリシン、D-ソルビトール、スクロース。なお()はBowmanら(1996)が用いた基質の型を示す。表中の利用の記載において、()は光学異性体の型を示す。表中のサイクロバクター・パシフィセシスの欄における陽性菌株の頻度：+，100%；+v，67%；-v，

15 33%；-，0%。他のサイクロバクター種の欄における陽性菌株の頻度：+，100-90%；v+，89-11%；v-，10-0%。w：弱い反応。

NIBH P2K6菌株は、サイクロバクター・パシフィセシスの基準株であると規定された。

表 6

サイクロバクター・パシフィセシスの脂肪酸組成および主要キノン型

サイクロバクター・パシフィセシスの脂肪酸組成および主要キノン型					
Composition	Psychrobacter pacificensis			Average content	Psychrobacter
	NIBH strain no.				immobilis
	P2J3	P2K6*	P2K18		ATCC 43116
5	Fatty acid:				0.9
	10:0	1.3	Tr	1.2	0.8 (0.7)
	11:0	0.1	Tr	0.2	0.1 (0.1)
	12:0	2.2	0.8	2.3	1.8 (0.8)
	14:0	0.7	0.6	0.5	0.6 (0.1)
	14:1 (X1)	0.1	0.2	Tr	0.1 (0.1)
	15:0	0.4	Tr	0.4	0.3 (0.2)
	16:0	7.3	8.7	6.5	7.5 (1.1)
	16:1 (w7c)	9.7	15.8	6.6	10.7 (4.7)
10	16:1 (X2)	0.4	0.4	0.3	0.4 (0.1)
	17:0	2.7	5.6	4.8	4.4 (1.5)
	i17:0	0.6	Tr	0.4	0.3 (0.3)
	17:1 (X3)	5.1	1.5	5.1	3.9 (2.1)
	18:0	9.4	5.6	13.1	9.4 (3.8)
	18:1 (w7c)	1.2	0.8	0.7	0.9 (0.3)
	18:1 (w9c)	50.1	52.8	50.9	51.3 (1.4)
15	18:2	3.4	2.4	1.8	2.5 (0.8)
	19:0	0.4	0.4	0.6	0.5 (0.1)
	20:0	Tr	Tr	Tr	Tr
	Total	95.1	95.6	95.4	95.5
	Total unsaturated	70.0	73.9	65.4	69.8
	Hydroxy fatty acid:				
	3-OH 12:0	4.1	3.6	3.9	3.9 (0.3)
20	3-OH 14:0	0.8	0.8	0.7	0.8 (0.1)
	Total	4.9	4.4	4.6	4.6 (0.3)
	Major quinone type	Q-8	Q-8	Q-8	Q-8

X1-3: 正確な二重結合の位置は決定されていない。Tr: ごく微量(<0.1%)。

かっこ内の数字は標準偏差を示す(n=3)。*: 基準株。

- 25 *Psychrobacter pacificensis*は、好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非胞子形成性、オキシダーゼ陽性の長さ1.0-1.5 μm 、幅約1 μm の球桿菌である。これらの菌株は細胞外器官として多数のフィムブリエ（纖毛）を生ずるが、鞭毛は生じない。ポリペプトンおよび酵母抽出物を含む寒天プレート上に、縁が欠けていない円形で凸状の、色がオフホワイトのコロニーを形成する。蛍光色素は全く

形成されない。至適増殖には海水または約3%のNaClを必要とするが、殆どの菌株はNaCl濃度が0または8%以上の場合は増殖しない。4℃では定常期に達するのに1～2週間を要するが、これらの菌株は4℃で20℃における増殖収率(growth yield)に匹敵する増殖収率を示す。約25℃で至適増殖が起こり、限界増殖温度は38℃である。グルコース、キシロースおよびアラビノースから酸が好氣的に形成される。これらの菌株はウレアーゼ活性が陽性であるが、フェニルアラニンデアミナーゼおよびトリプトファンデアミナーゼについては陰性である。この種はグルコース発酵、インドール産生、エスクリン加水分解、ゼラチン加水分解およびアルギニンジヒドロラーゼという生化学試験について陰性である。この種は唯一の炭素およびエネルギー源としてL-ヒスチジンおよびDL-リンゴ酸を利用する。いくつかの菌株は酢酸、L-アラニン、3-ヒドロキシ-ブチレート、乳酸、マロン酸およびスベリン酸を利用するが、p-ヒドロキシ-ベンゾエート、クエン酸、グルコン酸、プロピオン酸、L-セリンまたはn-吉草酸を利用する菌株はない。18:1w9cが主要な脂肪酸であり、またQ 8が主要なキノンである。DNA G+C含有量は、HPLCで測定すると43～44モル%である。基準株は、日本国八丈島沖日本海溝の深度6,000 mの海水から4℃で単離したNIBH P2K6である。この菌株は、財団法人醗酵研究所に寄託されている(IFO 16270)。また、Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6 (IFO 16270) は工業技術院生命工学工業技術研究所(日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に平成11年5月21日付けで寄託された(受託番号:FERM BP-7106)。

なお、Psychrobacter pacificensisは、当初、本発明者らによりPsychrobacter pacificusと命名されたが、その後、Psychrobacter pacificensisに名称変更されて新種登録されている(Maruyama et al., Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species Psychrobacter pacificensis sp. nov., Inter. J. Syst. Evol. Microbiol., 50 (2000) 835-846)。従って、Psychrobacter pacificensisが新種の微生物であることは、国際的に承認されている。

実施例 3

作製プローブのデータベース検索結果

配列中2つまでのミスマッチを許す条件で、配列番号2の塩基配列をプローブ配列（「Psypac469-487」と命名する。）としてRDP-DB（データベース）を検索したところ、Psypac469-487と一致するものは、該Psychrobacter pacificensisを除き、現在種登録されている基準菌株（タイプスピーズ）および明確な同定根拠が論文等に表示されている菌株の中には存在しなかった。ただし、データベース中には、登録番号（Accession No.）AF025555（Pinhassら；300bpの部分配列；表示はPsychrobacter glacincola）がミスマッチ0、U85874（Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 1997；表示はPsychrobacter sp.）、U85876, U85877, U85878, U85879（Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 1997；表示はPsychrobacter glacincola）、U85880（Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 1997；表示はPsychrobacter immobilis）がミスマッチ1、U85875（Bowmannら, Appl. Environ. Microbiol. 63, 3068-3078, 1997；表示はPsychrobacter sp.）、AF025579（Pinhassiら；442bpの部分配列；表示はPsychrobacter sp. Ant9）およびAF025577（Pinhassiら；501bpの部分配列；表示はMoraxella sp. Ant7）がミスマッチ2として検出された。これらの配列データの元となった菌株の同定根拠は明確でなく、その中には該Psychrobacter pacificensisが含まれている可能性が残されている。一方、見いだされた近似配列データの多くが南極域で得られた菌株からのものであることから、表示にあるように南極域での生息が既に確認されているPsychrobacter glacincolaおよびその近縁種に由来している可能性も否定できない。

以上の結果は、該Psypac469-487プローブの塩基配列が、既存菌株を網羅するDNAデータベース上でPsychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種に相補性を示すのみで、本プローブが本二種の種特異的検出に極めて有効であることを示す。

実施例 4

作製プローブのハイブリダイゼーション試験結果（1）

（1）微生物試料の調整

用いた微生物試料の属種株名は、表7に示した。この中で、Psychrobacter p

acifensis菌株は、八丈島沖日本海溝の6000m深海水試料より4℃で培養可能な微生物として分離されたもので、表層海水中には全く見出されなかった(Maruyama et al. Marine Biology 128, 705-711, 1997)。 Bacillus marinusはMarine Broth (Difco) を用いて好気条件下20℃で、 Psychrobacter phenylpyruvicusは
5 ATCC Culture Medium 4番を用いて好気条件下30℃で、培養した。これ以外の細菌は、1/2TZ 液体培地 (Maruyama et al., J. Oceanogr. 49, 353-367, 1993)を用いて好気条件下10~20℃で培養した。

培養された微生物は、最終濃度3%のパラフォルムアルデヒドを用いて4℃で一晩固定された。パラフォルムアルデヒドは、3 x PBS (Phosphate
10 Buffer Saline: NaCl: 24 g, KCl: 0.6 g, Na₂HPO₄: 0.72 g, pH 7.4) 中に15%となるように予め溶解しておき、試料: パラフォルムアルデヒド=4:1で混合して使用した。

(2) 試料のDNAプローブによる染色

この固定した微生物細胞を、あらかじめゼラチンを塗布した直径11mmの穴
15 の開いたテフロンコートスライド上に吸着させ、エタノール脱水、または室温で一晩乾燥させた。その後、試料穴中にハイブリダイゼーション溶液 (NaCl: 0.9M, リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0): 50mM, EDTA: 5mM, SDS: 0.5%, Denhardt solution: final x10, Poly (A): 1.0mg/ml) を50μl添加した。上記のように調
20 整したスライドグラスを、乾燥を防ぐために少量の3 x PBSを加えた50mlコニカルチューブ内に静置し、42~45℃で30分間のプレハイブリダイゼーションを行った。

5' 末をCy 5, TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート) またはFITC (フルオレセインイソチオシアネート) でラベル化した蛍光標識
25 オリゴヌクレオチドDNAプローブを作成し、上記ハイブリダイゼーション溶液にそれぞれのプローブを1ng/μlとなるように添加し、42~45℃で4時間半のハイブリダイゼーションを行った。未反応のオリゴヌクレオチドプローブDNAを除去するために、44~45℃の洗浄溶液 (NaCl: 0.9M, リン酸ナトリウム: 0.5mM, SDS: 0.1%, pH=7.0) 中にスライドグ

ラスを入れ、30分間洗浄した。

用いたオリゴヌクレオチドDNAプローブとしては、該 Psypac469-487の他、ドメイン Bacteria (旧称 Eubacteria) の共通プローブである Eub338-355 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT (配列番号8)) やコントロール用の Cont (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG (配列番号9))を用いた。

(3) 試料のDNA染色

ハイブリダイゼーション終了後、スライドグラスに終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ のDAPI溶液を加え、室温で10分間反応させ、微生物細胞内に存在するDNAの染色を行った。反応終了後、純水中にスライドグラスを浸し、15分間洗浄した後、室温で乾燥した。

(4) 試料の蛍光顕微鏡観察

乾燥させたスライドグラスの微生物試料上にDABCO (ジアゾビスクロオプタン) 溶液 (1 g/100 ml (10 ml PBS+90 ml Glycerol)) 等の退色防止剤を加え、カバーグラスを載せ、油浸条件下で蛍光顕微鏡による観察を行った。必要に応じ、蛍光顕微鏡に取り付けた冷却CCDカメラで各々の色素に対する蛍光画像を取得し、画像を解析した。結果を表7に示す。

表7

FISH法による蛍光顕微鏡下でのプローブ有効性試験の結果

使用菌株	蛍光標識 DNAプローブ			DAPI染色
	Control	Psypac 469-487	Euba 338-355	
<i>Psychrobacter pacificensis</i> NIBH P2J2	×	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2J3	×	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2J13	×	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2K6 (=IFO 16270)	×	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2K18	×	○	○	○
<i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 483*	×	○	○	○
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ACAM 304	×	×	○	○
<i>Psychrobacter immobilis</i> ATCC 43116	×	×	○	○
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 15174	×	×	○	○
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> ATCC 233	×	×	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12689	×	×	○	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> IFO 12711	×	×	○	○
<i>Bacillus marinus</i> ATCC 29841	×	×	○	○

*:DNA データベース上では、*P. endoglaciecola* として登録された。

以上の結果は、1～2個のミスマッチを許す比較的穏和な条件でのin situハイブリダイゼーション(whole cellハイブリダイゼーションともいう)により、実際に作製したプローブがPsychrobacter pacificensisおよびPsychrobacter glaucincolaに属する菌株に特異的に結合し、他の属種の菌株とは結合しないことを示す。

実施例 5

作製プローブのハイブリダイゼーション試験結果(2)

(1) 微生物試料の調整

用いた微生物試料の属種株名は、表8に示した。この中で、Psychrobacter p
10 acificensis菌株は、八丈島沖日本海溝の6000 m深海水試料より4℃で培養可能な微生物として分離されたもので、表層海中には全く見出されなかった(Maruyama et al. Marine Biology 128, 705-711, 1997)。Bacillus marinusは Marine Broth (Difco) を用いて好気条件下20℃で、Psychrobacter phenylpyruvicus は ATCC Culture Medium 4番を用いて好気条件下30℃で、培養した。こ
15 れ以外の細菌は、1/2TZ 液体培地(Maruyama et al., J. Oceanogr. 49, 353-367, 1993)を用いて好気条件下10～20℃で培養した。

培養された微生物は、最終濃度3%のパラフォルムアルデヒドを用いて4℃で一晩固定された。パラフォルムアルデヒドは、3 x PBS (Phosphate Buffered Saline: NaCl: 24 g、KCl: 0.6 g、N
20 a₂HPO₄: 0.72 g、pH 7.4) 中に15%となるように予め溶解しておき、試料: パラフォルムアルデヒド = 4: 1 で混合して使用した。

(2) 試料のDNAプローブによる染色

この固定した微生物細胞を、あらかじめゼラチンを塗布した直径11mmの穴の開いたテフロンコートスライド上に吸着させ、エタノール脱水、または室温で
25 一晩乾燥させた。その後、試料穴中にハイブリダイゼーション溶液(NaCl: 0.9M, リン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0): 50mM, EDTA: 5mM, SDS: 0.5%, Denhardt solution: final x 10, Poly(A): 1.0mg/ml) を50μl 添加した。上記のように調整したスライドガラスを、乾燥を防ぐために少量の3 x PBSを加えた50ml

コニカルチューブ内に静置し、46℃でプレハイブリダイゼーションを30分間行つた。

5'末をCy5, TRITC (テトラメチルローダミンイソチオシアネート) またはFITC (フルオレセインイソチオシアネート) でラベル化した蛍光標識オリゴヌクレオチドDNAプローブを作成し、上記ハイブリダイゼーション溶液にそれぞれのプローブを1 ng/μlとなるように添加した。各々のオリゴヌクレオチドDNAプローブの最適条件 (下記参照) で4時間半ハイブリダイゼーションを行つた。その後、未反応のオリゴヌクレオチドプローブDNAを除去するため、スライドガラスを洗浄溶液 (NaCl: 0.9 M, リン酸ナトリウム: 0.5 mM, SDS: 0.1%, pH=7.0) 中に入れ、44℃で30分間洗浄した。

用いたオリゴヌクレオチドDNAプローブとそのハイブリダイゼーション最適条件 (括弧で示した) は、該Psypac469-487 (35%フォルムアミド溶液中46℃)、ドメイン Bacteria (旧称 Eubacteria) の共通プローブである Euba 33 8-355 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT: 配列番号8) (20%フォルムアミド溶液中46℃)、ユニバーサルプローブのUniv1390-1407 (5'-GACGGGCGGT GTGTACAA: 配列番号10) (0%フォルムアミド溶液中42℃) とした (Maruyama and Sunamura, Applied and Environmental Microbiology, 66, 2211-2215, 2000)。また、非特異的吸着の有無を調べるため、コントロール用としてCont (5'-GTGCCAGCAGCCGCGG: 配列番号9) (0%フォルムアミド溶液中42℃) を用いた。

(3) 試料のDNA染色

ハイブリダイゼーション終了後、スライドガラスに終濃度5 μg/mlのDAPI溶液を加え、室温で10分間反応させ、微生物細胞内に存在するDNAの染色を行つた。反応終了後、純水中にスライドガラスを浸し、15分間洗浄した後、室温で乾燥した。

(4) 試料の蛍光顕微鏡観察

乾燥させたスライドガラスの微生物試料上にDABCO (ジアゾビスクロオプタン) 溶液 (1 g/100 ml (10 ml PBS+90 ml Glycerol)) 等の退色防止剤を加

え、カバーガラスを載せ、油浸条件下で蛍光顕微鏡による観察を行った。必要に応じ、蛍光顕微鏡に取り付けた冷却CCDカメラで各々の色素に対する蛍光画像を取得し、画像を解析した。結果を表8に示す。

表8 FISH法による蛍光顕微鏡下での Psypac 469-487 プローブの有効性試験結果

使用菌株	蛍光標識 DNAプローブ				DAPI染色
	Control	Psypac 469-487	Euba 338-355	Univ 1390-1407	
<i>Psychrobacter pacificensis</i> NIBH P2J2	x	○	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2J3	x	○	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2J13	x	○	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2K6 (=IFO 16270)	x	○	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> NIBH P2K18	x	○	○	○	○
<i>P. pacificensis</i> ACAM 483*	x	x	○	○	○
<i>Psychrobacter glacincola</i> ACAM 304	x	x	○	○	○
<i>Psychrobacter frigidicola</i> ATCC 43116	x	x	○	○	○
<i>Psychrobacter immobilis</i> ATCC 15174	x	x	○	○	○
<i>Psychrobacter urativorans</i> ATCC 23333	x	x	○	○	○
<i>Psychrobacter phenylpyruvicus</i> IFO 12689	x	x	○	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 12711	x	x	○	○	○
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 29841	x	x	○	○	○
<i>Bacillus marinus</i>	x	x	○	○	○

*:DNA データベース上では *P. endoglaecicola* と記載されていたが、新種登録に伴い本種名に決定された。

以上の結果は、1個のミスマッチをも許さない厳格な条件でのin situハイブリダイゼーション（whole cellハイブリダイゼーションともいう）により、実際に作製したプローブがPsychrobacter pacificensisに属する菌株のみに特異的に結合し、他の属種の菌株とは結合しないことを示す。

- 5 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願は、参照によりその全体を本明細書に組み入れるものとする。

産業上の利用の可能性

- 本発明のオリゴヌクレオチドプローブにより、深層海水の循環を知る上で有用な指標生物としてのPsychrobacter pacificensisを分子・細胞レベルで高感度、
- 10 高精度に検出できる。深層海水の挙動解析やその影響評価のためには多数の微生物試料を扱う必要があるため、従来の培養法では洋上での煩雑な分離・培養操作および陸上での分類・同定作業に多大な労力と時間が必要であったが、既存のデータベースでその種特異性が確認された塩基配列からなる本発明のDNAプローブを用いることにより、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincol
- 15 aおよびこれらの近縁種の検出や同定、ならびにPsychrobacter pacificensisの種特異的な検出や同定の迅速化、省力化を図ることができる。さらに、本発明の新規低温細菌Psychrobacter pacificensisにより、深層水や深海域の新規な指標生物が提供される。

請求の範囲

1. 配列番号 1 の塩基配列を有する 16S rDNA。
2. 配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブ。
- 5 3. 配列番号 1 の塩基配列の一部が配列番号 2 の塩基配列である請求項 2 記載のプローブ。
4. Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定するための請求項 2 または 3 記載のプローブ。
- 10 5. 配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificensis、Psychrobacter glacincolaおよびこれらの近縁種からなる群より選択される細菌を検出または同定する方法。
6. Psychrobacter pacificensisに属する細菌を特異的に検出または同定するための請求項 2 または 3 記載のプローブ。
- 15 7. 配列番号 1 の塩基配列の一部を含むオリゴヌクレオチドプローブを用いて、Psychrobacter pacificensisに属する細菌を特異的に検出または同定する方法。
8. 好気性、グラム陰性、非運動性、無色、非孢子形成性、およびオキシダーゼ陽性であることを特徴とするPsychrobacter pacificensis。
9. Psychrobacter pacificensis NIBH P2K6 (FERM BP-7106) である、請
20 求項 6 記載のPsychrobacter pacificensis。

SEQUENCE LISTING

<110> Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<120> Novel Psychrotrophic Bacteria and DNA Probes for Detecting
The Bacteria

<130> PH-999-PCT

<150> JP 11-145342

<151> 1999-05-25

<150> PCT/JP00/02045

<151> 2000-03-30

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1526

<212> DNA

<213> Psychrobacter pacificensis

<220>

<221> rRNA

<222> (1).. (1526)

<400> 1

ttigtatcatg gctccagatt gaacgactgg gcggcaggct taacacatgc aagtcgagcg 60
 gaaacgatga tagcttgcia itaggcgctc agcngccgga cgggtgagta atacttagga 120
 atctacctag tagtggggga tagctcgggg aaactegaat taataccgca tacgtctacg 180
 ggagaaagca ggggntcatt agaccttgcg ctattagatg agcctaagtc ggattagcta 240
 gatggtgggg taaaggccta ccatggcgac gatctgtagc tggctcagga ggatgatcag 300
 ccacaccggg actgagacac ggcccggact ctacgggagg cagcagtgga gaatatigga 360
 caatggnggg aacctgac cagccatgcc gcgtgigtga agaaggcctt ttggttgtaa 420
 agcactttaa gcagtgaaga agactcttcg gttaatacc ggggacgatg acattagctg 480
 cagaataagc accggctaac tctgtgccag cagccgcggg aatacagagg gtgcaagcgt 540
 taatcggaat tactgggcgt aaagcgagcg taggtggcct gataagtcag atgtgaaatc 600
 cccgggccta acctgggaac tgcactcga actgttaggc tagagtaggt gagagggaag 660
 tagaattica ggtgtagcgg tgaaatgcgt agagatctga aggaataccg atggcgaagg 720
 cagcttcctg gcatcatact gacactgagg ctcgaaagcg tgggtagcaa acaggattag 780
 ataccctggt agtccacgcc glaaacgatg tctactagtc gttgggtccc ttgaggactt 840
 agtgacgcag ctaacgcaat aagtagaccg cctggggagt acggccgcaa ggttaaaact 900
 caaatgaatt gacgggggcc cgcacaagcg gtggagcatg tggtttaatt cgatgcaacg 960
 cgaagaacct tacttggctt tgacatacac agaactctgt agagatacga gagtgccttc 1020
 gggaattgtg atacagggtc tgcattggctg tctcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt 1080
 aagtcgccga acgagcgcaa ccttgtcct tagttaccag cacttcgggt gggaactcta 1140
 aggatactgc cagtacaaa ctggaggaag gcggggacga cgtcaagtca tcatggccct 1200
 tacgaccagg gctacacacg tgctacaatg gtaggtacag agggcagcta cacagcgatg 1260
 tgatgcgaat ctcaaaaagc ctatcgtagt ccagattgga gtctgcaact cgactccatg 1320
 aagtaggaat cgctagtaat cgcggatcag aatgccgcgg tgaatacgtt cccgggcctt 1380
 gtacacaccg cccgtcacac catgggagtt gattgcacca gaagtggta gcctaactta 1440
 gtgaggcgga tcaccacggt gtggctgatg actgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt 1500
 aggggaacct gcggctggat caccctc 1526

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 2

taatgtcatc gtccccggg

19

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 3

tcctacggga ggcagcagtg

20

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 4

catcgtttac ggcgtaggac

19

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 5

gtccacgccg taaacgatg

19

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 6

ttgcgctcgt tgcgggac

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 7

gtcccgcaac gagcgcaa

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 8

gctgcctccc gtaggagt

18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 9

gtgccagcag ccgcgg

16

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthetic DNA

<400> 10

gacgggCGgt gtgtacaa

18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/11, C12Q1/68, C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ

BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	PubMed:10758895 A. Maruyama et al., "Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species <i>Psychrobacter pacificensis</i> sp. nov." Int.J.Syst.Evol.Microbiol., 50, pp.835-846, March 2000	1-9
X	Marine Biology, 128, 1997	8-9
Y	A. Maruyama et al., "Low temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench", pp.705-711	1-7
Y	Applied and Environmental Microbiology, 63(8), August 1997	1-7
A	John P. Bowman et al., "Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice", pp.3068-3078	8-9
Y	International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4), October 1996, John P. Bowman et al., "Novel <i>Psychrobacter</i> species from Antarctic ornithogenic soils", pp.841-848	1-7
A		8-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2000 (21.08.00)

Date of mailing of the international search report
05 September, 2000 (05.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/03372

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/11, C12Q1/68, C12N1/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DBJ/GENESEQ
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	PubMed:10758895 A. Maruyama et al., "Phylogenetic analysis of psychrophilic bacteria isolated from the Japan Trench, including a description of the deep-sea species <i>Psychrobacter pacificensis</i> sp. nov." Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 50, p. 835-846, Mar. 2000	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21.08.00

国際調査報告の発送日

05.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号特許庁審査官 (権限のある職員)
鈴木 恵理子

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

9838

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	Marine Biology, 128, 1997	8-9
Y	A. Maruyama et al., "Low temperature adaptation of deep-sea bacteria isolated from the Japan Trench" p. 705-711	1-7
Y	Applied and Environmental Microbiology, 63(8), Aug. 1997	1-7
A	John P. Bowman et al., "Diversity and association of psychrophilic bacteria in Antarctic sea ice", p. 3068-3078	8-9
Y	International Journal of Systematic Bacteriology, 46(4), Oct. 1996,	1-7
A	John P. Bowman et al., "Novel Psychrobacter species from Antarctic ornithogenic soils", p. 841-848	8-9